

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.01.2009**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **25.08.2010**
(Věstník č. 34/2010)

(21) Číslo dokumentu:

2009-44

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Praha 10 -
Hostivař, CZ

(72) Původce:

Beran Miloš Ing., Praha 5, CZ
Urban Marian Ing., Praha 7, CZ

(74) Zástupce:

Ministerstvo zemědělství ČR, Mgr. Hana Jirkalová,
Těšnov 17, Praha 1, 11705

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob izolace beta-glukanů rozpustných v
alkalickém prostředí z hub**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu izolace β -glukanů nerozpustných ve vodě, ale rozpustných v alkalickém prostředí, z hub. Podstatou je kyselá hydrolyza desintegrované houbové biomasy ve vodném roztoku anorganické kyseliny o koncentraci 0,1 až 15 % hmotn. za zvýšené teploty 40 až 100 °C a oddělení produktu ve formě hydrogelu jako svrchní vrstvy sedimentu po odstředění suspenze. Kyselou hydrolyzou je degradována a převedena do roztoku část biopolymerů houbové biomasy - bílkovin, některých polysacharidů, nukleových kyselin a lipidů.

Způsob izolace β -glukanů rozpustných v alkalickém prostředí z hub

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu izolace β -glukanů nerozpustných ve vodě, ale rozpustných v alkalickém prostředí, z hub.

Dosavadní stav techniky

Léčivé vlastnosti hub byly v Asii, zvláště v Číně, využívány již několik tisíciletí a jsou popsány již ve starověkých čínských rukopisech. V průběhu několika posledních desetiletí byla identifikována celá řada biologicky aktivních sloučenin hub a byla potvrzena jejich klinická účinnost. Mezi komerčně nejvíce využívané houby s dokumentovanými léčivými účinky patří *Ganoderma lucidum* (reishi nebo ling zhi, lesklókorka lesklá), *Lentinus* (*Lentinula*) *edodes* (shiitake, houževnatec jedlý), *Phellinus linteus* (ohňovec), *Porio cocos*, *Auricularia auricula* (ucho jidášovo), *Hericius erinaceus* (korálovec ježovitý), *Grifola frondosa* (maitake, trsnatec lupenitý), *Flammulina velutipes* (penízovka sametonohá), *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná), *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* (outrovka pestrá), *Tremella fuciformis* (rosolovka řasotvorná) a *Schizophyllum commune* (klanolístka obecná). Rychlý rozvoj separačních technologií umožnil izolaci a purifikaci aktivních sloučenin, zvláště polysacharidů, s reprodukovatelnými antikarcinogenními účinky. Většina z nich působí jako stimulatory imunitního systému, některé však ničí rakovinné buňky přímo. Pouze u některých těchto látek však byla účinnost na lidský organismus objektivně potvrzena klinickými pokusy.

Polysacharidy s protinádorovými účinky izolované z hub (plodnic, mycelií, submersně kultivované biomasy nebo kultivačního média) většinou patří mezi β -D-glukany rozpustné ve vodě, heterosacharidy obsahující kromě glukanových řetězců také xylózu, mannosu, galaktózu nebo uronové kyseliny,

případně proteoglykany obsahující kromě glukanových struktur také vázané bílkoviny. Některé z těchto sloučenin jsou účinné i po orální aplikaci.

Glukany jsou lineární či větvené oligosacharidy či polysacharidy, složené z molekul glukózy, spojených glykosidickými vazbami. Jednotlivé glukany se odlišují typem glykosidických vazeb, molekulovou hmotností a prostorovou strukturou. Podle vzájemné prostorové orientace glukózových jednotek v polymerním řetězci jsou rozlišovány α - a β - glykosidické vazby. Čísla 1,3,4,6 dále, označující typ vazby, identifikují uhlíkové atomy glukózy, spojené touto vazbou. K nejběžnějším glukanům patří škrob, obsahující amylosu (vazba α 1,4) a amylopektin (vazba α 1,4 s větvením vazbou α 1,6) , glykogen (vazba α 1,6) a celulóza (vazba β 1,4). Kromě celulózy, která je hlavní stavební látkou rostlinných primárních buněčných stěn a spolu s ligninem se podílí na stavbě sekundárních buněčných stěn, existují i další typy β -glukanů. Tyto β -glukany hrají významnou roli jako strukturální složka buněčných stěn v pluchách obilných zrn, zejména ječmene a ovsa, kvasinek, některých plísní, vyšších hub, řas, lišejníků i některých bakterií. β -glukany hrají důležitou roli v potravinářství jako zahušťovadla a rozpustná vlákna.

Makromolekulární struktura glukanů závisí na zdroji a způsobu jejich izolace. Přírodní β -glukany jsou charakterizovány primární strukturou, typem vazeb, rozpustností, stupněm větvení, molekulární hmotností, nábojem polymeru, konformací v roztoku (trojitá šroubovice, jednoduchá šroubovice, náhodná smyčková konformace). Tyto vlastnosti významným způsobem ovlivňují biologickou aktivitu β -glukanů [1].

Nejběžnějším zdrojem β -(1,3/1,6)-D-glukanů jsou kromě hub a plísní buněčné stěny pekařských kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*). β -(1,3/1,4)-D-glukany jsou extrahovány z některých druhů obilí, zejména ovsa a ječmene. Kvasničné β -(1,3/1,6)-D-glukany jsou většinou nerozpustné. Obilné β -glukany patří mezi rozpustné i nerozpustné polysacharidy. Mezi další zdroje patří řasy nebo různé bakterie. Bakteriální β -1,3-D-glukany se nazývají kurdliny.

β -glukany bývají někdy zařazovány mezi tzv. modifikátory biologické odpovědi, které aktivují odpověď organismu na infekční či nádorové

onemocnění. Imunostimulační aktivita je asociována s tříhelixovou konformací základního β -1,3 glukanového řetězce, větvení v pozici β -1,6 potom biologické účinky zvyšuje. Po desetiletí intenzivního výzkumu byly v polovině osmdesátých let v Japonsku schváleny dva komerční preparáty houbových β -glukanů, lentinan a schizophyllan, k léčbě některých nádorů.

β -glukany stimulují všechny základní typy imunitních buněk, především pak makrofágy, neutrofily a NK buňky. Aktivace těchto buněk následně spouští celou kaskádu metabolických procesů, které jsou nezbytné pro udržení optimální hladiny imunitních reakcí. β -glukan ale ovlivňuje i humorální část imunitních reakcí [2].

Před více než 20 lety byly objeveny specifické buněčné receptory β -glukanů [3], které byly identifikovány jako komplementový receptor typu 3, CR3 [4], a později popsány specifický receptor dectin-1 [5-7]. CR3 receptory jsou přítomné na povrchu makrofágů, monocytů, neutrofilů a NK buněk (přirozené zabíječské buňky, které usmrcují zejména nádorové buňky a buňky infikované viry). Aktivace komplementového receptoru CR3 má za následek aktivaci komplementu a spuštění komplikované kaskády dějů, zahrnující jak humorální imunitu (tvorba protilátek, produkce řady důležitých cytokinů jako IL-1, IL-6 a TNF- α), tak i imunitu buněčnou (makrofágy, NK buňky). β -glukan stimuluje produkci buněk kostní dřeně, což má za následek zvýšení přísunu imunitních buněk jak do krve, tak i do všech orgánů zúčastňujících se obranných reakcí [8]. Komplementový receptor tvořený bílkovinným komplexem je přítomen na makrofázích v průběhu celého diferenciačního cyklu, od jejich vzniku v kostní dřeni. Zralé makrofágy se nacházejí prakticky ve všech tkáních, včetně centrálního nervového systému. Po aktivaci navázáním β -1,3-D-glukanu dojde k aktivaci všech funkcí makrofágu, včetně fagocytózy, uvolňování cytokinů a zpracování antigenu. Makrofágy se podstatným způsobem účastní neustále probíhajících detoxifikačních procesů, udržování střevní flóry, antiinfekční a protinádorové ochrany a udržování celkové integrity organismu.

Vazba β -glukanů na komplementový receptor přispívá k cytotoxické aktivitě opsonizovaných cílových buněk a podporuje protinádorovou imunitu. Navázání β -glukanu na CR3 receptor zvyšuje proliferační aktivitu monocytů a neutrofilů. Vazebná místa pro β -glukany byla také prokázána na dermálních fibroblastech a Langerhansových buňkách.

Prostřednictvím receptoru CR3 pravděpodobně působí pouze nízkomolekulární a ve vodě rozpustné β -glukany. Po vazbě β -glukanu na receptor dochází k prostorové změně receptoru a k jeho specifické aktivaci. Mezi hlavní efektorové buňky stimulované ve vodě rozpustnými β -glukany patří makrofágy, monocyty, neutrofilové a NK buňky.

Vysokomolekulární nerozpustné β -glukany nebo komplexy obsahující β -glukan, jako je kvasničný zymosan (komplex β -glukanu s mannanem a bílkovinou), se specificky vážou na jiný typ receptoru, nacházející se na leukocytech - Dectin-1, který je v současné době považován za primární receptor zprostředkovávající specifickou vazbu β -glukanů [5].

β -glukany bývají aplikovány injekčně, orálně nebo ve formě gelů či krémů pro vstřebávání pokožkou. Jedním z hlavních mechanismů účinku orálně aplikovaných β -glukanů je aktivace makrofágů v Peyerových placích tenkého střeva prostřednictvím β -glukanových buněčných receptorů. Orální administrace β -glukanů významně zvyšovala systemické hladiny interleukinu IL-12 a zvyšovala přežití u myši infikovaných mikroorganismy *Staphylococcus aureus* nebo *Candida albicans*. Byl prokázán také transport rozpustných β -glukanů z gastro-intestinálního traktu do systemické cirkulace [9]. Dále byla popsána aktivace makrofágů, NK buněk a T-lymfocitů v Peyerových placích prostřednictvím cytokinů uvolňovaných epitelovými buňkami typu M (specializované antigen prezentující buňky), aktivovanými vazbou orálně administrovaných β -glukanů u myši [10-12]. Tato aktivace střevních imunitních buněk vysvětluje účinnost nerozpustných β -glukanových preparátů.

β -glukany administrované transdermálně pokožkou aktivují kožní buňky keratinocyty a speciální kožní makrofágy, nazývané Langerhansovy buňky. Tyto buňky slouží pro identifikaci antigenu a jeho transport do lymfatických

uzlin a hrají důležitou roli při regeneraci kůže, hojivých procesech a udržování integrity kůže [13,14].

Přípravky s β -glukanem jsou určeny pro hojení ran, k léčbě infekčních onemocnění, k podpůrné léčbě zhoubných nádorových onemocnění, ke stimulaci nespecifického i specifického imunitního systému, ke kompenzaci nežádoucích účinků z radioterapie, chemoterapie nebo imunosupresivní léčby, nebo k podpůrné léčbě dermatologických onemocnění. Jiné použití se nachází i v prevenci či profylaxi před ozářením UV paprsky, při fyzických i psychických zátěžových situacích apod. Aplikace β -glukanu nachází své uplatnění i u dlouhodobě nemocných či zdravotně rizikových skupin, např. u kardiovaskulárních onemocnění, diabetes mellitus, HIV infekcí nebo při vysokém věku. β -glukany působí také jako antioxidanty a snižují hladinu celkového cholesterolu v krvi, čímž snižují riziko vzniku aterosklerózy. Řada studií potvrdila synergický účinek antibiotik a β -glukanu při potlačování infekčních onemocnění. Významný synergický účinek byl pozorován také při kombinované léčbě β -glukany a různými protinádorovými přípravky. Preklinické i klinické studie vlivu β -glukanu na léčbu rakoviny dále prokázaly, že pokud je β -glukan podáván současně se specifickými protilátkami, jeho imunostimulační vliv se násobí [15].

Další studie popisují protialergický účinek β -glukanů související s ovlivňováním poměru Th1/Th2 lymfocitů směrem k Th1 prostřednictvím cytokinu IL-12, produkovaným v peritoneálních makrofázích po jejich aktivaci. Je známo, že převaha lymfocytů Th2 přispívá ke zvýšení hladiny specifických protilátek IgE a tím ke vzniku alergických projevů.

β -glukany jako antiinfekční činidlo jsou výjimečně mimořádně širokým spektrem působení. Povaha aktivace makrofágů těmito polysacharidy je nespecifická. Mezi mikroorganismy, u kterých byl prokázán ochranný vliv β -glukanů, patří různé bakterie, plísňe, kvasinky, viry i paraziti.

Výše popsané léčebné účinky byly ve většině případů potvrzeny řadou klinických studií a souhrnně popsány v řadě přehledových článků [16 - 20].

Fyziologické účinky β -glukanů mohou být cíleně ovlivňovány změnami jeho fyzikálně - chemických vlastností. K eliminaci frakce β -1,6-D-glukanu a následnému zvýšení viskozity se používá kyselá hydrolýza kyselinou octovou. Snížení molekulové hmotnosti β -glukanových molekul a viskozity a zároveň zvýšení rozpustnosti preparátu lze docílit působením specifických enzymů s β -glukanázovou aktivitou. Převedení nerozpustných β -glukanů na rozpustné formy lze docílit také chemickou derivatizací, jako je například sulfatace či karboxymetylace.

Mezi hlavní komerční preparáty s léčivými vlastnostmi na bázi β -glukanu, jejichž účinnost byla potvrzena klinickými pokusy, patří lentinan (*Lentinus edodes*, houževnatec jedlý), schizophyllan (*Schizophyllum commune*, klanolístka obecná). Lentinan je vysokolekulární β -1,3-D-glukan s β -1,6 pravidelným větvením, rozpustný ve vodě, tvořící trojitou šroubovici. V klinických pokusech byla potvrzena silná protinádorová aktivita. V Japonsku byl registrován jako lék a je používán pro pomocnou léčbu některých typů rakoviny. Fyziologické aktivity lentinanu byly souhrnně popsány v přehledových člancích [21-24]. Také schizophyllan patří mezi ve vodě rozpustné β -(1,3/1,6)-D-glukany. Nedegradovaný polysacharid má molekulovou hmotnost v řádu 10^6 .

Také další sloučeniny izolované z léčivých hub s potenciálně antikarcinogenními účinky byly již úspěšně testovány v preklinických pokusech [25]. Slovenská firma Pleuran uvedla na trh nerozpustný skeletální β -(1,3/1,6)-D-glukan hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) s obchodním názvem PleraSAN® ve formě potravních doplňků a kosmetických přípravků. β -glukany se objevují i na českém trhu, namátkou lze zmínit přípravky obsahující rozpustné houbové β -glukany *Pleuromax*, *Pleurevital* a *Pleuranox* české firmy 7 RED, s.r.o. Na trhu je také řada kvasničných β -glukanů, zejména nerozpustných, např. WGP 3-6 β -Glucan (BioThera, Inc., ABAC's yeast glucan (ABAC) nebo Beta Right™ Beta-glucan (Biopolymer Engineering, Inc).

Byla publikována celá řada studií, popisujících různé metody izolace z hub či z kvasnic. Izolace lentinanu z houževnatce jedlého (*Lentinus edodes*)

byla popsána v několika publikacích [26-28]. Laboratorní metodika izolace tohoto rozpustného β -glukanu je založena na extrakci houbové biomasy horkou vodou s následným srážením rozpustných polysacharidů přídavkem etanolu. Získaná sraženina je použita pro další frakcionaci a purifikaci jednotlivých složek.

Byl popsán také postup izolace nerozpustného skeletálního β -glukanu houževnatce jedlého [29]. Tento postup je založen na alkalické hydrolýze. Nerozpustný zbytek obsahuje β -(1,3/1,6)-D-glukan s chitinem a malé množství nerozložené bílkoviny. Strukturální analýza s použitím metylační analýzy a enzymu β -1,3-glukanázy ukázala strukturální heterogenitu tohoto skeletálního glukanu. Vnější vrstva buněčné stěny obsahuje glukan s β -1,3 a β -1,6 vazbami, prostorovou strukturou připomínající lentinan. Střední část stěny obsahuje zejména β -1,6-D-glukan. Vnitřní část je tvořena vysoce větveným β -(1,3/1,6)-D-glukanem.

Ve vodě rozpustné β -glukany byly izolovány také z různých druhů hlívy. Jednalo se o α -D-glukan s převládající vazbami α -1,6 [30] a větvený směsný α,β -glukan [31]. Z různých druhů hlívy byly izolovány i β -(1,3/1,6)-D-glukany nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v alkalickém prostředí [32]. Konformační analýza odhalila strukturu v podobě trojitě šroubovice [33]. Publikované metody izolace tohoto typu glukanů jsou založeny na alkalické extrakci. Další autoři popsali izolaci nerozpustného skeletálního β -glukanu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), nazývaného pleuran, alkalickou hydrolýzou [34]. Základní struktura tohoto polysacharidu je tvořena β -D-glukopyranosylovými jednotkami propojenými β -1,3 glykosidickými vazbami, s každou čtvrtou substituovanou v pozici 0-6 jednoduchou D-glukopyranosylovou jednotkou. Polysacharid obsahoval také malé množství (7 % hmotn.) β -1,6 a β -1,4 vazeb. Pleuran podporoval přežití myši infikovaných bakteriální infekcí.

Izolaci β -glukanu popisuje také více než 100 patentů. Velká většina těchto patentů se týká izolace β -glukanů z hub a kvasnic. Dalšími zdroji jsou také obilí, řasy, některé další mikroorganismy a kultivační media obsahující fermentačně produkované rozpustné exacelulární β -glukany. Podstatná

většina všech těchto patentů se týká ve vodě rozpustných β -glukanů [např. patenty JP59210901, JP2002104988 nebo GB1279104], menší část β -glukanů rozpustných v alkalickém prostředí či β -glukanů zcela nerozpustných ve vodném prostředí nezávisle na pH.

Základním principem dosud patentovaných způsobů izolace houbových β -glukanů rozpustných ve vodě je extrakce horkou vodou, následovaná separací extrahovaného β -glukanu srážením etanolem či jiným způsobem. Získaný produkt je většinou dále frakcionován a purifikován.

Slovenská firma Pleuran je majitelem patentů CZ293310, WO02085950 popisujících izolaci nerozpustného skeletálního β -glukanu pleuranu z plodnic hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) defibrilací v roztoku uhličitanu sodného či draselného bělením peroxidem vodíku v alkalickém prostředí s následnou dehydratací etanolem či acetonem nebo lyofilizací. Izolaci pleuranu popisují i další patenty. Patenty CS274918 a WO9312243 chrání postup zahrnující alkalickou hydrolýzu plodnic hlívy ústříčné ředěným roztokem NaOH za varu, odfiltrování nerozpustného zbytku obsahujícího nerozpustnou β -glukanovou frakci, bělení chlornanem sodným, promytí, dehydrataci organickým rozpouštědlem, s výhodou etanolem či acetonem, a vakuové sušení konečného produktu. Patent CS276192 zahrnuje defibrilaci biomasy plodnic hlívy ústříčné v ředěném roztoku NaOH, deproteinaci koncentrovaným roztokem peroxidu vodíku, filtraci, promytí, homogenizaci a sušení získaného pleuranu. Patent SK285062 popisuje postup výrobu pleuranu spočívající v extrakci hlívy ústříčné ředěným roztokem šťavelanu amonného s cílem odstranění nízkomolekulárních cukrů, alkalické hydrolýze ředěným roztokem NaOH, promytí nerozpustného zbytku demineralizovanou vodou, okyselení kyselinou octovou, bělení peroxidem vodíku, dehydrataci etanolem a vakuovém sušení produktu. Patent US2007066563 popisuje postup produkce hydrogelu nerozpustného β -glukanu připraveného alkalickou hydrolýzou hub, například hlívy, s následnou hydratací ve vysokorychlostním mixeru ve vodném roztoku. Japonský patent JP200568114 popisuje způsob převedení nerozpustných β -glukanů obsažených v hlívě *Pleurotus cornucopiae* na

rozpustnou formu s použitím enzymu s endo- β -glukanázovou aktivitou. Způsob přípravy rozpustných β -glukanů hlívy ústříčné popisuje patent WO2006119783.

Výrobu lentinanu, rozpustného β -glukanu houževnatce obecného (*Lentilus edodes*), popisuje celá řada čínských patentů, např. patenty CN1613876, CN101268825, CN101261203 nebo CN101215591. Korejský patent KR20040090374 chrání způsob produkce ve vodě rozpustných polysacharidů obsahujících β -glukan z houževnatce obecného.

V kvasničné biomase se β -(1,3/1,6)-D-glukany vyskytují zejména ve formě nerozpustného komplexu, tvořícího základní strukturu buněčné stěny, nazývaného zymosan. Zymosan je komplex obsahující β -glukan, mannan a bílkovinu. Tento nerozpustný komplex má významné biologické imunostimulační aktivity [35,36]. Mechanismem jeho působení je aktivace imunitních buněk v Peyerových placích v tenkém střevě prostřednictvím specifických buněčných receptorů [5]. Nerozpustný zymosan či glukomannanový komplex je možno převést na ve vodě rozpustnou formu částečnou hydrolýzou působením enzymů s β -glukanázovou aktivitou, při zachování jeho imunostimulačních vlastností, jak popisují např. WO2004061115, JP2002209598. Pro průmyslové účely je k hydrolýze buněčných stěn kvasinek a plísni používán preparát zymolyáza izolovaný z bakterie *Arthrobacter luteus*, který obsahuje enzymy β -1,3 glukanázu a β -1,3-glukan laminaripentao-hydrolázu.

Přípravu nerozpustných kvasničných β -glukanů nebo glukomannanového komplexu popisuje také celá řada patentů. Patenty JP60196195 a US5037972 navrhuje pro výrobu β -glukanů použití kombinovanou enzymovou a alkalickou hydrolýzu kvasničné biomasy. Postup výroby β -glukanů kombinovanou oxidativní degradací silnými oxidačními činidly a alkalickou hydrolýzou biomasy buněk z různých zdrojů, včetně kvasinek a vyšších hub (*Basidiomycetes*), nárokují patenty EP0811690 a JP9322795. Patent US2007299034 popisuje použití kombinované alkalické a kyselé hydrolýzy kvasničné či fungální biomasy s cílem izolovat chitin, chitin-

glukanový komplex či chitosan. Použití kombinované alkalické a kyselé hydrolýzy kvasničné biomasy, následované promytím nerozpustného produktu etanolem, nárokuje za účelem výroby β -glukanů také patent CA2072145. Podobný postup výroby kvasničných β -glukanů s použitím různých organických rozpouštědel pro promytí produktu alkalické a kyselé hydrolýzy popisuje také patent CN1583802. Patenty US4810646 a US5037972 podrobně popisují nerozpustnou β -glukanovou frakci připravenou alkalickou hydrolýzou kvasničné biomasy hydrolýzou kyselinou octovou, s cílem eliminovat β -1,6-glukanový podíl z konečného produktu. Použití kyselé hydrolýzy kvasničné biomasy pro produkci β -glukanů nárokuje patent KR20040077050. Patent EP0819762 popisuje pro výrobu kvasničného β -glukanu postup využívající alkalickou hydrolýzu za přítomnosti povrchově aktivních látek a s promytím produktu etanolem.

Další patenty nárokuje postupy zahrnující autolýzu kvasničné biomasy v elektrolyzované alkalické vodě (US2007004013) nebo v kombinaci s alkalickou hydrolýzou (WO2008032134). Výroba β -glukanové a mannanové frakce kombinovanou autolýzou a enzymovou hydrolýzou s přidanými enzymy je popsána v patentech US2006263415 a WO2006121803. Produkci frakcí β -glukanů a rozpustných mannanů kombinací autolýzy a použití enzymů s proteolytickými, glukanázovými a lipolytickými aktivitami nárokuje patent US2006263415. Jiný způsob izolace frakce polysacharidů obsahující velké množství β -glukanů popisuje patent JP2003000197. Tento postup využívá fermentační opracování kvasničné biomasy s využitím bakteriální kultury s exogenní proteolytickou a β -glukanázovou aktivitou. Použití enzymové hydrolýzy buněčných stěn, získaných po mechanické desintegraci kvasničné biomasy, s cílem oddělit nerozpustnou β -glukanovou a rozpustnou mannanovou frakci, navrhuje patent WO0008201. Patentovány byly i způsoby izolace β -glukanu s použitím ultrazvuku při vyšších teplotách (WO2008138559) a superkritické extrakce (KR20020083538). Stále však chybí efektivní způsob získávání požadovaných β -glukanů, které by byly sice

nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v alkalickém prostředí. Získávané β -glukany je nutno vždy různě přechistit.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob izolace β -glukanů rozpustných v alkalickém prostředí z hub, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že mechanicky desintegrovaná houbová biomasa se podrobí kyselé hydrolýze ve vodném roztoku anorganické kyseliny o koncentraci 0,1 až 15 % hmotn. za zvýšené teploty 40 až 100 °C a získané β -glukany jsou ze směsi poté odděleny ve formě hydrogelu jako svrchní vrstva sedimentu po odstředění suspenze biomasy.

Způsob izolace β -glukanů se dále vyznačuje tím, že jako houbová biomasa jsou použity plodnice hlívy (*Pleurotus spp.*) či houževnatce jedlého (*Lentinus edodes*).

Způsob izolace β -glukanů se ještě vyznačuje tím, že získané β -glukany jsou β -(1,3/1,6)-D-glukany.

Způsob izolace podle vynálezu popisuje originální, doposud nepopsaný způsob izolace β -glukanů z houbové biomasy, které jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v alkalickém prostředí. Oproti doposud publikovaným způsobům izolace tohoto typu β -glukanů nabízí nový způsob řadu výhod, spočívajících v rychlosti, jednoduchosti, nízkých nákladech a šetrnosti vůči životnímu prostředí. Získaný produkt je dostatečně čistý a nevyžaduje nezbytně další čištění.

Principem předkládaného vynálezu je kyselé hydrolýza mechanicky desintegrované houbové biomasy ve vodném roztoku anorganické kyseliny o koncentraci 0,1 až 15 % hmotn. za zvýšené teploty a oddělení žádaných β -glukanů ve formě hydrogelu jako svrchní vrstvy sedimentu po odstředění suspenze. Kyselou hydrolýzou je degradována a převedena do vodného roztoku část biopolymerů houbové biomasy - bílkovin, některých polysacharidů, nukleových kyselin a lipidů. Zbývající sediment po oddělení

β -glukanů jako svrchní vrstvy hydrogelu obsahuje zejména nerozpustné skeletální β -glukany, chitin, a zbylou část bílkovin a lipidů, resistantních vůči kyselé hydrolýze. Tento zbývající sediment je možné použít k purifikaci nerozpustného skeletálního β -glukanu s použitím alkalické hydrolýzy, nebo jiné metody popsané v literatuře, s vysokým výtěžkem. Nerozpustný skeletální β -glukan může být potom dalším produktem popsaného výrobního postupu.

Jako výchozí surovinu je možno použít čerstvé, mražené nebo sušené plodnice hub, s výhodou i odpadní části, jako jsou odřezky nohou. Vhodnou surovinou jsou například plodnice různých druhů hlívy, či houževnatec jedlý. V tomto případě jsou produktem β -(1,3/1,6)-D-glukany. Kromě plodnic hub je možno jako výchozí surovinu použít i houbové mycelium či buněčnou kulturu hub připravenou submersní kultivací.

Konečný produkt - hydrogel β -glukanů - může být usušen lyofilizací, vakuovým sušením po promytí etanolem či jiným vhodným organickým rozpouštědlem nebo v rozprašovací sušárně. Připravené β -glukany mají široké použití ve farmacii a potravinářství.

Následující příklady použití způsob podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

50 g sušené hlívy ústříčné bylo homogenizováno ve 2 litrech 2 % hmotn. HCl s použitím ponorného mixeru a směs byla 30 minut povařena. Po vychladnutí byla směs odstředěna na velké laboratorní kyvetové odstředivce *Janetzki K 70 D* s objemem kyvet 1 ltr při odstředivé síle přibližně 3000 x g po dobu 25 minut. Supernatant po odstředění byl zlikvidován. Horní gelová vrstva byla mechanicky oddělena a důkladně opakovaně promývána destilovanou vodou a odstřeďována až do hodnoty pH promývací vody přibližně 6,0.

Promytý gel byl lyofilizačně usušen. Bylo získáno 2,1 g vláknitého materiálu světle béžové barvy. Výtěžnost produktu byla 4,2 % hmotn.

Produkt byl nerozpustný ve vodě, ale dokonale rozpustný v alkalickém prostředí. Spektra FT-IR ATR a ^{13}C CP-MAS tohoto produktu jsou na obrázcích 1 a 2, vzorek č. 2. Z analýzy spekter vyplývá, že se jedná o β -(1,3/1,6)-D-glukan, obsahující pouze velmi malá množství zbytkových bílkovin a lipidů. Vzorek obsahuje pravděpodobně i stopy chitinu.

Příklad 2

4,5 kg čerstvé hlívy ústřičné o sušině 9,8 % hmotn. bylo homogenizováno ve 20 litrech 2 % obj. HCl s použitím ponorného mixeru a směs byla 30 minut povařena. Po vychladnutí byla směs odstředěna na průtokovém bubnovém odstředivém separátoru, např. *Westfalia, Typ LWA 205* při 12000 ot./min. Po otevření bubnu byla vnitřní gelová vrstva sedimentu mechanicky oddělena a důkladně opakovaně promývána destilovanou vodou až do hodnoty pH promývací vody přibližně 6,0. Sediment produktu byl od promývací vody oddělován sedimentací, eventuálně flotací. Promytý gel byl lyofilizačně usušen. Bylo získáno 25 g vláknitého materiálu světle béžové barvy. Výtěžnost produktu byla 5,7 % hmotn. na vloženou sušinu.

Produkt byl nerozpustný ve vodě, ale dokonale rozpustný v alkalickém prostředí. Spektra FT-IR ATR a ^{13}C CP-MAS tohoto produktu jsou na obrázcích 1 a 2, vzorek č. 1b. Z analýzy spekter vyplývá, že se jedná o β -(1,3/1,6)-D-glukan, obsahující pouze velmi malá množství zbytkových bílkovin a lipidů. Vzorek obsahuje pravděpodobně i stopy chitinu.

Příklad 3

4 kg mraženého houževnatce jedlého o sušině 10,1 % hmotn. bylo homogenizováno v 18 litrech 2 % hmotn. HCl s použitím ponorného mixeru a směs byla 30 minut povařena. Po vychladnutí byla směs odstředěna na

průtokovém bubnovém odstředivém separátoru, např. *Westfalia, Typ LWA 205* při 12000 ot./min. Po otevření bubnu byla vnitřní gelová vrstva sedimentu mechanicky oddělena a důkladně opakovaně promývána destilovanou vodou až do hodnoty pH promývací vody přibližně 6,0. Sediment produktu byl od promývací vody oddělován sedimentací, eventuálně flotací. Promytý gel byl lyofilizačně usušen. Bylo získáno 22 g vláknitého materiálu světle béžové barvy. Výtěžnost produktu byla 5,45 % hmotn. na vloženou sušinu.

Příklad 4

100 g sušeného houževnatce jedlého bylo homogenizováno ve 4 litrech 2 % hmotn. HCl s použitím ponorného mixeru a směs byla 30 minut povařena. Po vychladnutí byla směs odstředěna na velké laboratorní kyvetové odstředivce, např. *Janetzki K 70 D*, s objemem kyvet 1 litr při odstředivé síle přibližně 3000 x g po dobu 25 minut. Supernatant po odstředění byl zlikvidován. Horní gelová vrstva byla mechanicky oddělena a důkladně opakovaně promývána destilovanou vodou a odstředována až do hodnoty pH promývací vody přibližně 6,0. Promytý gel byl lyofilizačně usušen. Bylo získáno 4,3 g vláknitého materiálu světle béžové barvy. Výtěžnost produktu byla 4,3 % hmotn.

Spektra FT-IR ATR a ^{13}C CP-MAS tohoto produktu jsou na obrázcích 1 a 2, vzorek č. 3. Z analýzy spekter vyplývá, že se jedná o β -(1,3/1,6)-D-glukan, obsahující pouze velmi malá množství zbytkových bílkovin a lipidů. Vzorek obsahuje pravděpodobně i stopy chitinu.

Průmyslová využitelnost

Houbové β -glukany připravené podle tohoto vynálezu jsou určeny k použití jako potravinové doplňky, ingredienty funkčních potravin, kosmetických přípravků či hydrogelů pro hojení ran a spálenin.

Použitá literatura:

- 1) D.B. Zekovic, et al. (2005) Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology* **25** (4) 205-231
- 2) V. Vetvicka, B. Dvorak, J. Vetvickova, J. Richter, J. Krizan, P. Sima, and J.C. Yvin (2007) Orally-administered marine β-(1,3)-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *Int. J. Biol. Macromol.* **40**, 291-298
- 3) J.K. Czop, and K.F. Austen (1985) A β-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J. Immunol.* **134**, 2588-2593
- 4) V. Vetvicka, B.P. Thornton, and G.D. Ross (1996) Soluble β-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J. Clin. Invest.* **98**, 50-61
- 5) G.D. Brown, P.R. Taylor, D.M. Reid, J.A. Willment, D.L. Williams, L. Martinez-Pomares, S.Y.C. Wong, and Siamon Gordon (2002) Dectin-1 Is A Major {beta}-Glucan Receptor On Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* **196** (3) 407-412
- 6) D.M. Reid, M. Montoya, P.R. Taylor, P. Borrow, S. Gordon, G.D. Brown, and S.Y.C. Wong (2004) Expression of the β-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *Journal of Leukocyte Biology Volume* **76**, 86-94
- 7) J. Baran, D.J. Allendorf, F. Hong, and G.D. Ross (2007) Oral beta-glucan adjuvant therapy converts nonprotective Th2 response to protective Th1 cell-mediated immune response in mammary tumor-bearing mice. *Histochemica et Cytobiologica* **45** (2) 107-114

- 8) M.L. Patchen, and T.J. MacVitti (1983) Dose-dependent responses of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of the immunomodulating agent glucan. *Immunopharmacology* 1983, 5, 303-313
- 9) P.J. Rice, E.L. Adams, T. Ozment-Skelton, A.J. Gonzalez, M.P. Goldman, B.E. Lockhart, L.A. Barker, K.F. Breuel, W.K. DePonti, J.H. Kalbfleisch, H.E. Ensley, G.D. Brown, S. Gordon, and D.L. Williams (2005) Oral Delivery and Gastrointestinal Absorption of Soluble Glucans Stimulate Increased Resistance to Infectious Challenge. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **314** (3) 1079-86
- 10) T. Sakurai, K. Hasimoto, I. Suzuki, N. Ohno, S. Oikawa, A. Masuda, and T. Yadomae (1992) Enhancement of murine alveolar macrophage functions by orally administered β -glucan. *Int J Immunopharmacol* **14**, 821-830
- 11) I. Suzuki, K. Hashimoto, N. Ohno, H. Tanaka, and T. Yadomae (1989) Immunomodulation by orally administered β -glucan in mice. *Int J Immunopharmacol* **11**, 761-769
- 12) I. Suzuki, H. Tanaka, A. Kinoshita, S. Oikawa, M. Osawa, and T. Yadomae (1990) Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol* **12**, 675-684
- 13) F. Zulli, F. Suter, H. Biltz, and H.P. Nissen (1998) Improving skin function with CM-glucan, a biological response modifier from yeast. *Int J Cosmet Sci.* **20** (2) 79-86
- 14) C. Reis e Sousa, P.D. Stahl, and J.M. Austyn (1993) Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med.* **178** (2) 509-19
- 15) F. Hong, J. Yan, J.T. Baran, D.J. Allendorf, R.D. Hansen, G.R. Ostroff, P.X. Xing, N.K. Cheung, and G.D. Ross (2004) Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models, *J. Immunol.* **173**, 797-806
- 16) D. Akramiene, A. Kondrotas, J. Didziapetriene, and E. Kevelaitis (2007) Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* **43**(8)597-606

- 17) M.S. Mantovani, M.F. Bellini, J.P. Angeli, R.J. Oliveira, A.F. Silva, and L.R. Ribeiro (2008) Beta-Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutat Res.* **658** (3) 154-61
- 18) J. Chen, and R. Seviour (2007) Medicinal importance of fungal beta-(1-->3), (1-->6)-glucans. *Mycol Res* **111**(Pt 6) 635-52
- 19) D.B. Zeković, S. Kwiatkowski, M.M. Vrvic, D. Jakovljević, and C.A. Moran (2005) Natural and modified (1-->3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Crit Rev Biotechnol.* **25** (4) 205-30
- 20) J. Douwes (2005) (1-->3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air.* **15** (3) 160-9
- 21) J. Hamito (2005). Anticancer immunotherapy with perorally effective lentinan. *Gan To Kagaku Ryoho* **32** (8) 1209-15
- 22) M. Suzuki, F. Takatsuki, Y.Y. Maeda, J. Hamuro, and G. Chihara (1994) Antitumor and immunological activity of lentinan in comparison with LPS. *Int J Immunopharmacol.* **16** (5-6) 463-8 Y.
- 23) Kaneko, and G. Chihara (1992) Potentiation of host resistance against microbial infections by lentinan and its related polysaccharides. *Adv Exp Med Biol.* **319**, 201-15.
- 24) G. Chihara, J. Hamuro, Y.Y. Maeda, T. Shio, T. Suga, N. Takasuka, and T. Sasaki (1987) Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview. *Cancer Detect Prev Suppl.* **1**, 423-43. Review.
- 25) J.E. Smith, N.J. Rowan, and R. Sullivan. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde. May 2002.
- 26) G. Chihara, J. Hamuro, Y. Maeda, Y. Arai, and F. Fukuoka (1970) Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**(11) 2776-81.

- 27) J. Turko, O. Lubiński, and B. Gutkowska (2004) Isolation of lentinan, an immunomodulating (1-3)- β -D-glucan from submerged cultivated mycelium of *Lentinus edodes* and culture medium. *Acta Pol Pharm.* **61** Suppl:40-2.
- 28) A.T. Yap, and M.L. Ng (2001) An improved method for the isolation of lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Int J Med Mushrooms* **3**, 9-19.
- 29) M. Shida, Y. Ushioda, T. Nakajima, and K. Matsuda (1981) Structure of the alkali-insoluble skeletal glucan of *Lentinus edodes*. *J. Biochem* **90** (4) 1093-100.
- 30) D. Rout, S. Mondal, I. Chakraborty, M. Pramanik, and S.S. Islam (2004) Structural characterisation of an immunomodulating polysaccharide isolated from aqueous extract of *Pleurotus florida* fruit-bodies. *Medicinal Chemistry Research* **13** (6-7) 509-517
- 31) M. Pramanik, I. Chakraborty, S. Mondal, and S.S. Islam (2007) Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr.I) of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Research* **342** (17) 2670-2675.
- 32) D. Chenghua, Y. Xiangliang, G. Xiaoman, W. Yan, Z. Jingyan and X. Hukni (2000) A β -D -glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Carbohydrate Research* **328** (4) 629-633.
- 33) D. Rout, S. Mondal, I. Chakraborty, and S.S. Islam (2008) The structure and conformation of a water-insoluble (1 $\rightarrow$ 3)-,(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research* **343** (5) 928-987
- 34) S. Karaczonyi, and L. Kuniak (1994) Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. *Carbohydrate Research* **24** (2) 107-111
- 35) V. Vetvicka, and Jana Vetvickova (2007) Physiological effects of different types of β -glucan. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **151** (2) 225-231
- 36) H. Tapper and R. Sundler (1995) Glucan receptor and zymosan-induced lysosomal enzyme secretion in macrophages. *Biochem J.* **306** (Pt 3) 829-835.

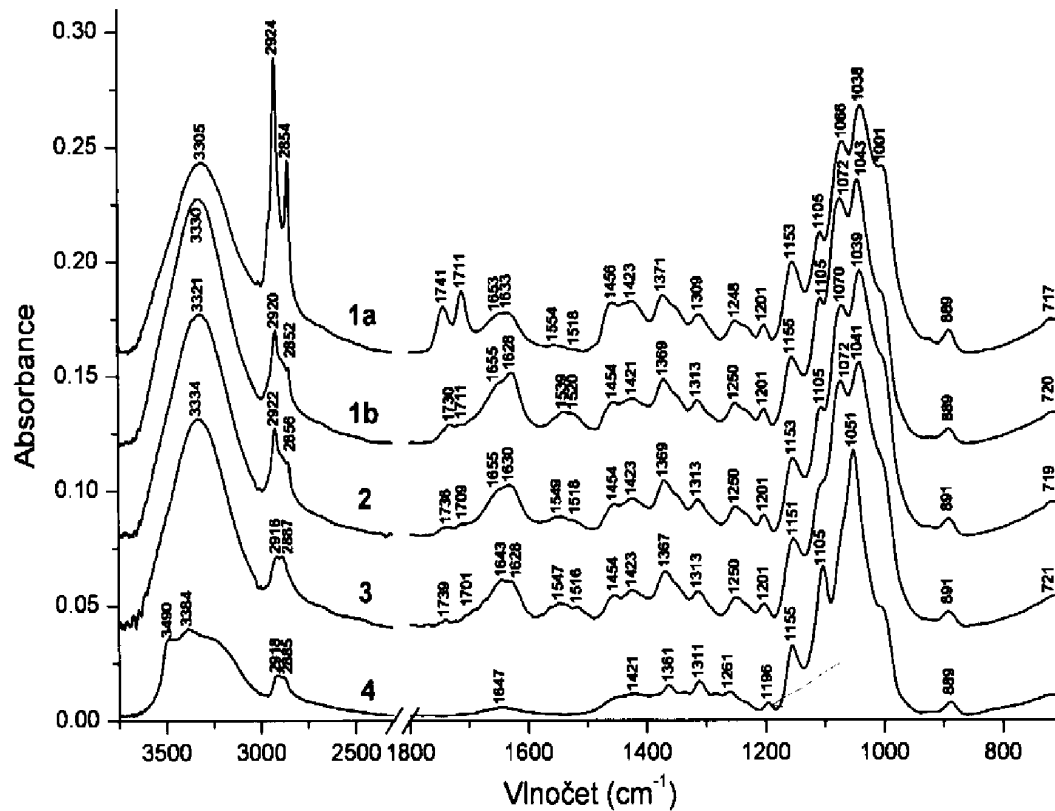
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob izolace β -glukanů rozpustných v alkalickém prostředí, ale nerozpustných ve vodě, z houbové biomasy, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že mechanicky desintegrovaná houbová biomasa se podrobí kyselé hydrolýze ve vodném roztoku anorganické kyseliny o koncentraci 0,1 až 15 % hmotn. za zvýšené teploty 40 až 100 °C a získané β -glukany jsou ze směsi poté odděleny ve formě hydrogelu jako svrchní vrstva sedimentu po odstředění suspenze biomasy.
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako houbová biomasa jsou použity plodnice hlívy (*Pleurotus spp.*) či houževnatce jedlého (*Lentinus edodes*).
3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že získané β -glukany jsou β -(1,3/1,6)-D-glukany .

4/2
X

27.01.09

PV 2009 - 44

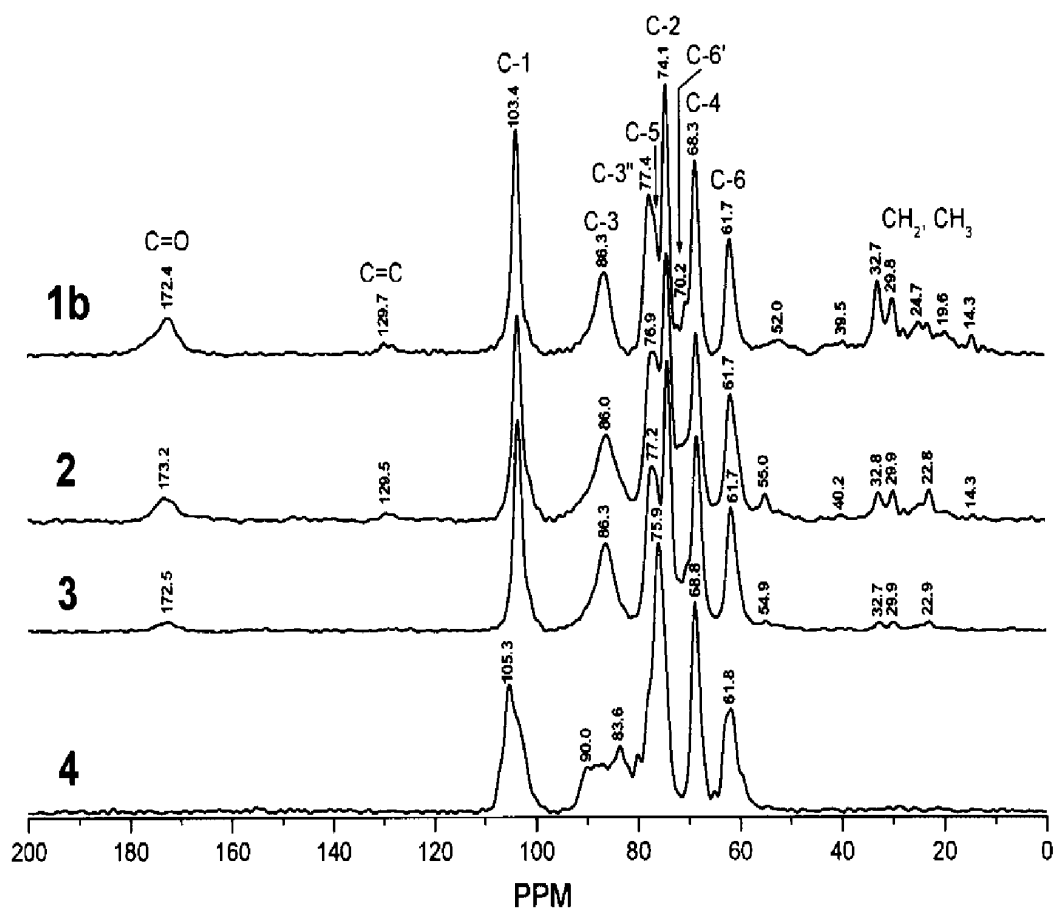


Obr. 1

Spektra FT-IR ATR (700 až 4000 cm^{-1}) izolovaných β -glukanů (vzorek 1a, 1b – čerstvá hlíva ústřičná; 2 – sušená hlíva ústřičná; 3 – sušený houževnatec jedlý) v porovnání se standardním vzorkem (4 – paramylon: β -1,3-glukan z *Euglena gracilis* (Sigma)).

2/2 X

27.01.09
PV 2009-44



Obr. 2

Spektra ^{13}C CP-MAS izolovaných β -glukanů (1b – čerstvá hlíva ústříčná vzorek; 2 – sušená hlíva ústříčná; 3 – sušený houževnatec jedlý) v porovnání se standardním vzorkem (4 – paramylon: β -1,3-glukan z *Euglena gracilis* (Sigma)).